

## JP58035146

Publication Title:

PREPARATION OF 2-KETO-6-METHYL-5-HEPTENOIC ACID ETHYL ESTER

Abstract:

Abstract of JP58035146

**PURPOSE:**To prepare the titled compound useful as a raw material for the partial synthesis of homoharringtonine, by condensing the Na salt of 2-keto-1,4-butanedioic acid diethyl ester with 1-bromo-3-methylbutene-(2) in the presence of a phase transfer catalyst, and decarboxylating the condensation product. **CONSTITUTION:**The compound of formula I is condensed with the compound of formula II in the presence of a phase transfer catalyst (e.g. benzyltriethylammonium chloride) to obtain 2-ethoxyoxalyl-5-methyl-4-hexenoic acid ethyl ester of formula III, which is decarboxylated to obtain the objective compound of formula IV in high yield and purity. Homoharringtonine synthesized from the compound of formula IV exhibits the activity to suppress the abnormal proliferation of cell, and useful as a remedy for non-lymphatic leukemia. It has comparable antitumor activity to and stronger biological activity than harringtonine which is homologue of the compound. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—35146

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 C 69/738  
67/32  
// B 01 J 31/02

識別記号

庁内整理番号  
6556—4H  
7059—4G

④ 公開 昭和58年(1983)3月1日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑤ 2-ケト-6-メチル-5-ヘプテン酸エチル  
ルエステルの製造方法

② 特 願 昭56—135257  
② 出 願 昭56(1981)8月28日  
⑦ 発 明 者 包天桐

東京都港区白金5丁目10番16号  
⑦ 出 願 人 イスクラ産業株式会社  
東京都中央区日本橋2丁目10番  
6号  
⑦ 代 理 人 弁理士 浅村皓 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

2-ケト-6-メチル-5-ヘプテン酸エチル  
エステルの製造方法

2. 特許請求の範囲

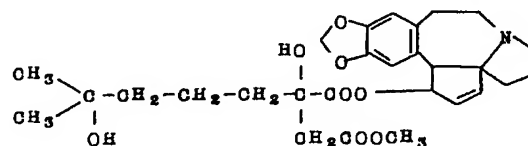
2-ケト-1,4-ブタンジオン酸ジエチルエ  
ステルのナトリウム塩を相転移触媒の存在下1-  
ブロモ-3-メチルブテン(2)と縮合させて2-エ  
トキシオキサリル-5-メチル-4-ヘキセン酸  
エチルエステルを得、これを脱カルボキシル化し  
て2-ケト-6-メチル-5-ヘプテン酸エチル  
エステルを得ることを特徴とする2-ケト-6-  
メチル-5-ヘプテン酸エチルエステルの製造方  
法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はホモハリントニンの部分合成法に使用  
される化合物である2-ケト-6-メチル-5-ヘ  
プテン酸エチルエステルの製造方法に関する。ホ  
モハリントニンについて非リンパ性白血病の治療  
剤として細胞異常増殖抑制作用を示すことがす

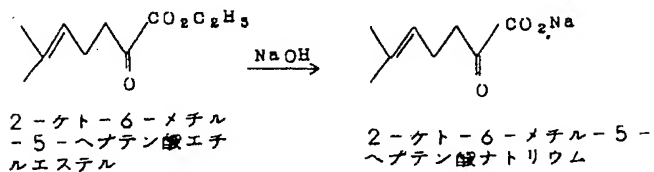
で「中華腫瘍雑誌」1(3)、176(1979)に  
報告された。

ところでホモハリントニンは次の構造式



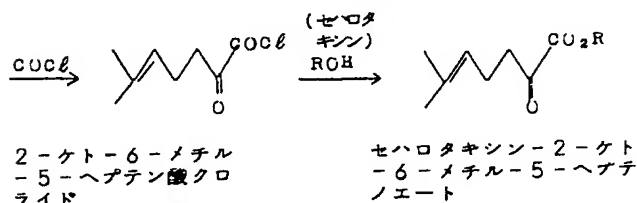
を有するアルカロイドとして中国原産植物である  
セハロタクサス・ハイナネンシス (cephalotaxus  
hainanensis) 中に存在することも報告されてい  
る。ホモハリントニンは別途出願(特願昭 )  
した同族体のハリントニンよりも、構造式におい  
て直鎖中メチレン基が一つ多い点が異なる。抗腫瘍  
性の範囲は同じであるが、生物学的活性はより強  
い。しかしながら天然の植物源にのみたよることは  
資源的にも限界があるので、植物中のアルカロ  
イド含量も少量であるので、ホモハリントニ  
ンを部分合成することにより臨床治療の需要に  
こたえることは意義のあることである。

処でかゝるホモハリントニンの部分合成に關して Acta Pharmaceutica Sennica 15 45 (1980) に發表された反應経路は次のとおりである。



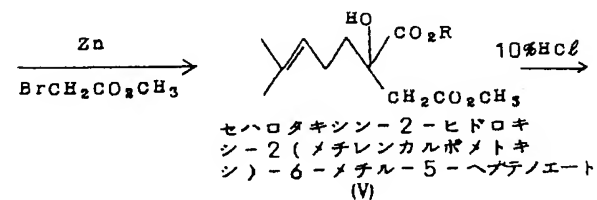
(I)

(II)

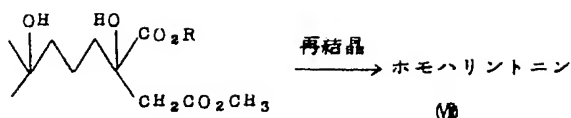
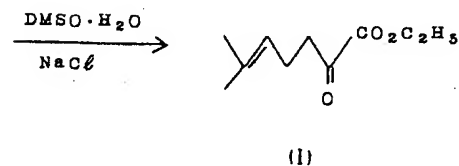
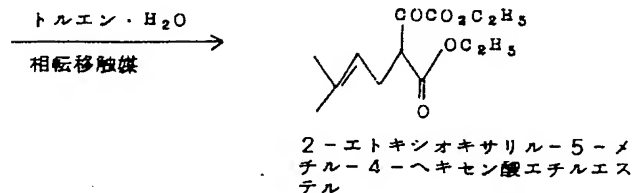
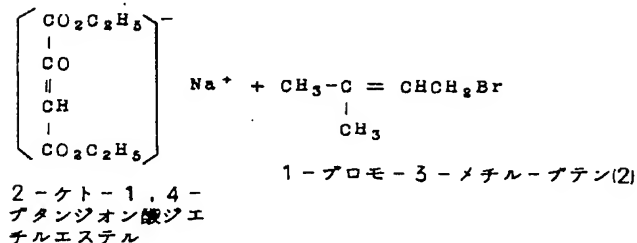


(III)

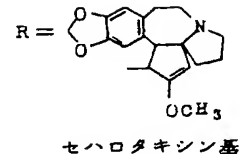
(IV)



ル・トリエチル・アンモニウムクロライドを使用する点が生成物の高収量と高純度とを得る鍵である。この反応を図示すれば



ホモハリントニン  
エビハリントニン  
(V)



本発明は上記ホモハリントニンの部分合成の出発物質である2-ケト-6-メチル-5-ヘプテン酸エチルエステル(以下化合物(I)と称する)の工業的に有利な新規合成方法に關する。

本発明によれば化合物(I)は2-ケト-1,4-ブタンジオン酸ジエチルエステルのナトリウム塩と1-プロモ-3-メチルブテン(2)とを反応させる新規反応により2-エトキシオキサリル-5-メチル-4-ヘキセン酸エチルエステルを生成し、ついでこれを脱カルボキシルして得られる。前段反応において相転移触媒として、たとえばベンジ

以下に実施例を示す。

#### 実施例

a) 2-エトキシオキサリル-5-メチル-4-ヘキセン酸エチルエステルの生成。

2-ケト-1,4-ブタンジオン酸ジエチルエステルのナトリウム塩(4.2g、0.2M)、ベンジル・トリエチル・アンモニウム・クロライド(2.2g、0.01M)とトルエン溶液とを攪拌しながら加熱した。内温が60℃に達して反応物がのり状になるように見えた時に激しく攪拌しながら水(1.8ml)、1-プロモ-3-メチルブテン(2)を滴下した。攪拌および加熱をさらに1.5時間続けた。その後、反応混合物は冷却され、透明の有機溶液は傾瀉されて、固形物はエーテルで数回洗浄された。洗浄エーテル液および有機溶液は一槽にしてから、水で、次いで5% NaHCO<sub>3</sub>で洗浄液のpHが7~8になるまで洗浄し、最後に水で洗つてからNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で有機溶液の脱水をした。溶液および低沸点の副生成物(70~75℃/7mm)を除去後、36.2gの淡黄色の残留物が得られた。

(収率70%)。この残留物は精製せずに(1)の合成に使用された。このものは質量スペクトル分析、NMR分析などより首題の化合物として同定された。

b) 2-ケト-6-メチル-5-ヘプテン酸エチルエステルの生成。

a)に得られた化合物(34.96g、0.136モル)、NaOH(8.45g、0.146モル)、水(7.6g、0.42モル)とジメチルスルホキシド(85ml)は内温125~130℃で7時間攪拌しながら加熱した。反応液は冷却後、残留NaOHを溶かすために適量の水を添加された。有機層は分離され、水層はエーテルで抽出された。エーテル抽出液は全部一緒にしてから、洗浄液のpHは7~8まで、飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液、飽和NaOH溶液で洗浄した後、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で脱水した。減圧濃縮でエーテルを除去した後、残留物は減圧蒸留で精製された。15gの80~82℃/3mm留分(収率60%) $n_D^{25}$  1.4507が得られた。このものは質量スペクトル分析、NMR分析などから首題の

化合物として同定された。

代理人 浅 村 皓  
外 4 名

## 手 続 補 正 書

昭和56年10月9日

特許庁長官殿

### 1. 事件の表示

昭和56年特許願第135257号

### 2. 発明の名称

2-ケト-6-メチル-5-ヘプテン酸  
エチルエステルの製造方法

### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

氏 名 イスクラ産業株式会社  
(名 称)

### 4. 代 理 人

居 所

〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新 大 手 町 ビ ル デ ィ ン グ 3 3 1  
電 話 (211) 3 6 5 1 (代 表)

氏 名

(6669) 浅 村 皓

### 5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

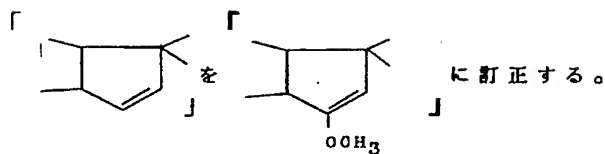
### 6. 補正により増加する発明の数

### 7. 補正の対象


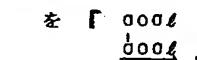
明細書の発明の詳細な説明の欄

### 8. 補正の内容 別紙のとおり

(1) 明細書第2頁の式の右の部分中、



(2) 同第3頁中程の図式左端の

「」を「」に訂正する。

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/55



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02159694.8

A61P 35/00 A61P 17/02

A61P 17/06 A61P 29/00

A61P 19/02 A61P 9/10

[43] 公开日 2004 年 7 月 14 日

[11] 公开号 CN 1511531A

[22] 申请日 2002.12.30 [21] 申请号 02159694.8

[71] 申请人 北京大学第一医院

地址 100034 北京市西城区西什库大街 8 号

北京大学第一医院外科

[72] 发明人 王振军 赵 博

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称 高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱在抑制血管生成中的应用

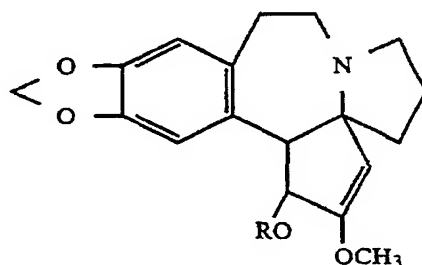
[57] 摘要

本发明公开了高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱在抑制血管生成中的新用途,研究表明,高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱具有抑制血管生成的作用。其技术方案是:式 I 化合物在制备抑制血管生成的治疗和/或预防药物中的应用,其有效剂量范围,高三尖杉酯碱为 0.03~0.1mg/Kg 体重/天;三尖杉酯碱为 0.05~0.1mg/Kg 体重/天。本发明巧妙地以血管生成做为治疗疾病的靶点,具有以下优点:1. 治疗针对已经启动的新生血管进行,具有特异性;2. 由于血管内皮细胞暴露于血流中,药物直接发挥作用,故剂量小,疗效高,副作用小;3. 由于内皮细胞基因表达相对稳定,故不易产生耐药性。

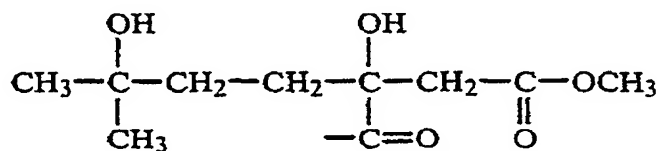
ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

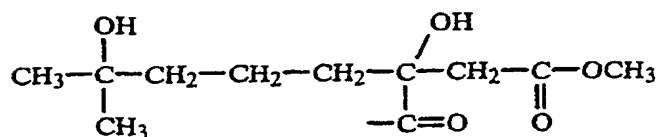
1、式 I 化合物在制备抑制血管生成的治疗和/或预防药物中的应用，其中，所述式 I 化合物中的 R 为式 II 或式 III。



(式 I)



(式 II)



(式 III)

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述式 I 化合物在制备抑制血管生成的药物中的有效剂量范围，高三尖杉酯碱为 0.03~0.1mg/Kg 体重/天；三尖杉酯碱为 0.05~0.1 mg/Kg 体重/天。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于：在制备抑制血管生成的药物中还加入一种或多种药学上可接受的载体。

4、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为治疗和/或预防癌症的

药物。

5、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为伤口愈合中抑制斑痕形成的药物。

6、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为治疗和/或预防糖尿病视网膜病、早熟视网膜病及视网膜静脉闭塞的药物。

7、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为治疗和/或预防银屑病

的药物。

8、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为治疗和/或预防老年盘状斑变性

及风湿性关节炎的药物。

9、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为治疗和/或预防血管瘤

的药物。

10、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述药物为治疗和/或预防动脉粥样硬化的药物。

## 高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱在抑制血管生成中的应用

### 技术领域

本发明涉及化合物的新用途，特别是涉及高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱的新用途。

### 背景技术

研究表明，肿瘤自身具备启动和促进新生血管生成的能力，以满足自身的新陈代谢和营养物质供应的需要。肿瘤新生血管的生成（angiogenesis）从已有血管床开始。如果没有血管生成，原发肿瘤的生长不会超过1~2 mm，也不会出现浸润和转移。抑制肿瘤血管生成，与阻断肿瘤的发生、发展、浸润和转移密切相关。抑制肿瘤血管生成，还可阻止癌前病变向癌的恶性转变。不仅实体肿瘤的生长、浸润和转移依赖新生血管生成，血液系统恶性肿瘤（如恶性淋巴瘤、淋巴细胞白血病等）的生长和转移也与血管生成密切相关。肿瘤的生长、转移、复发、预后与血管生成密切相关，以肿瘤的血管生成成为靶点，开发血管生成抑制剂，不但可用于大多数实体肿瘤的治疗，还可用于癌的预防和血液系统恶性肿瘤的治疗，同时对其他与血管生成有关的疾病如：糖尿病视网膜膜病变、风湿性关节炎、银屑病、血管瘤、动脉粥样硬化等的预防与治疗，都具有重要的理论及现实意义。

高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱，是从三尖杉科三尖杉属植物中提取的生物碱的一种，为周期非特异性抗肿瘤药，已经应用于临床。已阐明的高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱抗癌机制为：该药可使核糖体解聚，抑制蛋白质合成，使肿瘤细胞分裂指数减少，瘤组织核酸含量下降。该药在临床上主要用于急性早幼粒细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性粒细胞白血病及恶性淋巴瘤等，也用于慢性粒细胞白血病、真性红细胞增多症等，应用剂量为0.05~0.1mg/kg。国外已有高三尖杉酯碱用于治疗非淋巴细胞性白血病的专利（US4152214）。高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱虽然已经用于临床治疗肿瘤，有一定疗效，但由于其抗癌作用机制还不明确，剂量使用不合理，限制了其抗癌作用的发挥。

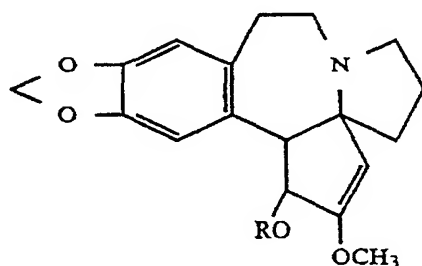
### 发明内容

本发明的目的是提供高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱的一种新用途。

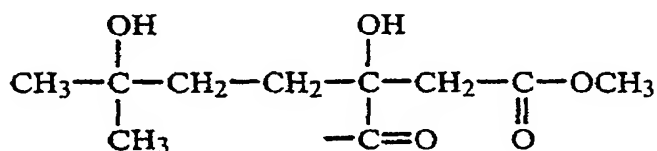
本发明发明人的研究表明，高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱具有抑制血管生成的作用，因此本发明的技术方案是：



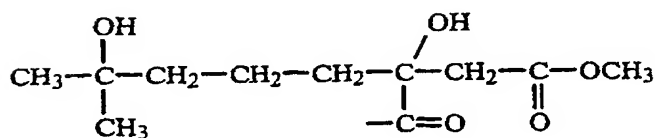
式 I 化合物在制备抑制血管生成的治疗和/或预防药物中的应用, 其中 R 为式 II 时, 得到的化合物为三尖杉酯碱; R 为式 III 时, 得到的化合物为高三尖杉酯碱。



(式 I)



(式 II)



(式 III)

需要的时候, 在上述式 I 化合物制备抑制血管生成的治疗和/或预防药物中还可以加入一种或多种药学上可接受的载体。所述载体包括药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体、润滑剂等, 必要时还可以加入香味剂、甜味剂等。

本发明的药物可以制成注射液、片剂、粉剂、粒剂、胶囊、口服液、膏剂、霜剂等多种剂型。上述各种剂型的药物均可以按照药学领域的常规方法制备。

高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱在制备抑制血管生成的治疗和/或预防药物中的应用时, 其有效剂量范围, 高三尖杉酯碱为 0.03~0.1mg/Kg 体重/天; 三尖杉酯碱为 0.05~0.1 mg/Kg 体重/天。

本发明的研究表明，除了治疗和/或预防癌症，以高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱为活性成分的抑制血管生成的治疗和/或预防药物，对于与血管生成有关的疾病如糖尿病视网膜病变、早熟视网膜病、视网膜静脉闭塞、老年盘状斑变性、风湿性关节炎、银屑病、血管瘤、动脉粥样硬化等疾病具有确切的治疗和预防作用，对伤口愈合中的斑痕形成也有显著的抑制作用。

本发明巧妙地以血管生成做为治疗疾病的靶点，具有以下优点：1、治疗针对已经启动的新生血管进行，具有特异性；2、由于血管内皮细胞暴露于血流中，药物直接发挥作用，故剂量小，疗效高，副作用小；3、由于内皮细胞基因表达相对稳定，故不易产生耐药性。

### 附图说明

图 1 为高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类血管内皮细胞增殖的剂量依赖性抑制作用曲线。

图 2 为不同浓度高三尖杉酯碱处理后人类血管内皮细胞管形成的光学显微镜照片。

图 3 为不同浓度三尖杉酯碱处理后人类血管内皮细胞管形成的光学显微镜照片。

图 4 为不同浓度高三尖杉酯碱处理后人类血管内皮细胞迁移结果的光学显微镜照片。

图 5 为不同浓度三尖杉酯碱处理后人类血管内皮细胞迁移结果的光学显微镜照片。

### 具体实施方式

实施例 1：高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类血管内皮细胞增殖的抑制作用。

将人类脐静脉内皮细胞（HUVEC，购自 Cascade Biologics 公司，Cot:C-003-5C）置于含 10%胎牛血清（FBS）的 Medium 200（购自 Cascade Biologics 公司）中培养（37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度），取第四代细胞按密度 4000/250ul 接种于 96 孔培养板中，设定对照组、各个浓度梯度的用药组及空白对照，每组均做 3 个复孔。待细胞生长密度达 80%，分别加入 5ul 各浓度梯度的高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱（以 DMSO 溶解），使终浓度分别为 100uM、10uM、5uM 和 1uM，对照组加入 5ulDMSO，继续培养（M200 培养基，2%FBS）48 小时后，加入 5mg/ml 的四唑溴盐（MTT）20ul，37°C 继续孵育 4 小时，终止培养，弃上清，每孔加入 150ulDMSO，轻轻振荡，1 小时后在 490nm 波长处用 BIO-RAD Model 3500 微板读数仪测定各孔吸光值，以吸光值表示各孔中活细胞的数量。上述实验重复 3 次。结果如图 1 所示，图中横坐标是药物浓度，纵坐标是吸

光值（与活细胞数量成正比）。结果显示，高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类脐静脉内皮细胞的增殖呈剂量依赖性抑制作用，其半数抑制量分别为 0.5 $\mu$ M 和 1 $\mu$ M。

实施例 2：高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类血管内皮细胞管形成能力的抑制作用。

24 孔培养板每孔加入 BD Matrigel™ Matrix 原胶 200 $\mu$ l，使之聚合成胶，第四代人类脐静脉内皮细胞（HUVEC）悬液按 30000cell/500 $\mu$ l 密度接种至涂有 Matrigel 胶的 24 孔板中，设定对照组、各个浓度梯度的用药组，用药组分别加入 10 $\mu$ l 有浓度梯度的高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱（其中高三尖杉酯碱的浓度分别为 0.25 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M；三尖杉酯碱的浓度分别为 0.5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M，以 DMSO 溶解），对照组加入无菌 DMSO 10 $\mu$ l，每组均做 3 个复孔。37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度培养 24 小时，OLYMPUS CK40-RFL 光学显微镜观察血管内皮细胞管的形成，每孔取 4 个低倍视野计数，以 OLYMPUS CK40 数码照相机拍照。结果如图 2、图 3 所示，表明高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类血管内皮细胞管形成能力呈剂量依赖性抑制，其半数抑制量分别为 0.25 $\mu$ M 和 0.5 $\mu$ M。

实施例 3：高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类血管内皮细胞迁移能力的抑制作用。

#### 1、制备趋化因子

取传代后第二天长势良好的 NIH3T3 细胞。无血清 DMEM 轻柔漂洗 2 次。无血清 DMEM，5%CO<sub>2</sub>，37℃培养 24—48hours。收集细胞上清。离心（12000g，4℃，10min）。上清滤菌（0.22 $\mu$ m 滤膜），分装保存（-20℃）。

#### 2、Matrigel 侵袭实验

取稀释的 Matrigel 25 $\mu$ l（原胶以 DMEM 按 1: 2 比例稀释）加入 Transwell 板上室，覆盖整个聚酯膜表面，37℃孵育 30min，使 Matrigel 聚合成胶。第四代人类脐静脉内皮细胞（HUVEC）悬液按 30000/250 $\mu$ l 密度接种至上室，PBS 洗涤 3 次从培养瓶中消化并收获细胞。用无血清 DMEM 制成单细胞悬液，5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/ml，用药组加入各浓度梯度的药物（高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱的浓度均为 1 $\mu$ M 和 10 $\mu$ M），对照组加入同体积的 DMSO。Transwell 板下室加入 500 $\mu$ l 步骤 1 制备的趋化因子。5%CO<sub>2</sub>，37℃培养 24 小时。用 DMEM 湿棉签轻轻擦去凝胶及聚酯膜上表面的细胞。小心取出上室，用冰预冷的甲醇固定 30 分钟。苏木素染色 1 分钟。梯度酒精脱水（80%，95%，100%，100%），二甲苯透明。小心将聚酯膜从上室切取下来，置于载玻片上中性树脂封片。附着于聚酯膜下表面的细胞在高倍镜下（400 $\times$ ）随机取 6 个视野计数取平均值并拍

照。重复实验 2 次。结果如图 4, 5 所示, 表明高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱对人类血管内皮细胞的迁移能力呈剂量依赖性抑制作用。

#### 实施例 4: 荷瘤裸鼠体内试验。

收获人类结肠癌细胞系 LoVo 细胞, 用 PBS 制成细胞悬液, 以 200 万/200ul 接种至 8 周大的 BALB/cAnN-nu/nu 裸鼠的右股部皮下。待瘤体生长至 5mmX5mm 大小时, 随机分成两组, 每组 5 只。高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱用药组给药剂量分别为 3.9mg/kg 和 5mg/kg(药物以含 10%DMSO 的 PBS 溶液溶解), 对照组给含 10%DMSO 的 PBS 溶液 200ul, 连续给药 60 天, 每天记录瘤体的长径和短径。用药期间, 小鼠未出现不良反应。处死小鼠后, 取出肿瘤, 检测肿瘤的微血管密度。结果显示, 用药组瘤体较对照组缩小, 生长明显减慢, 微血管密度明显低于对照组。说明该药具有体内抑制肿瘤的作用, 而且副作用很小。

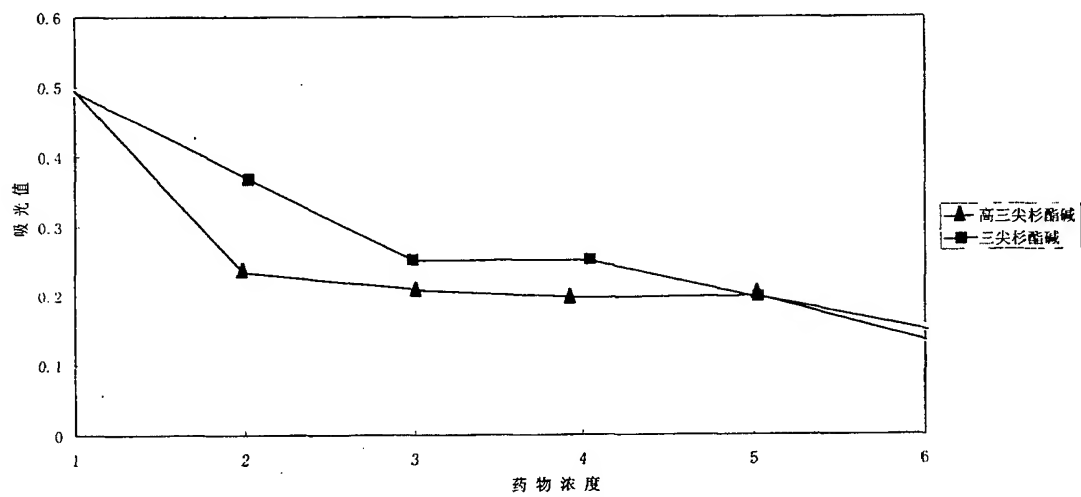


图 1

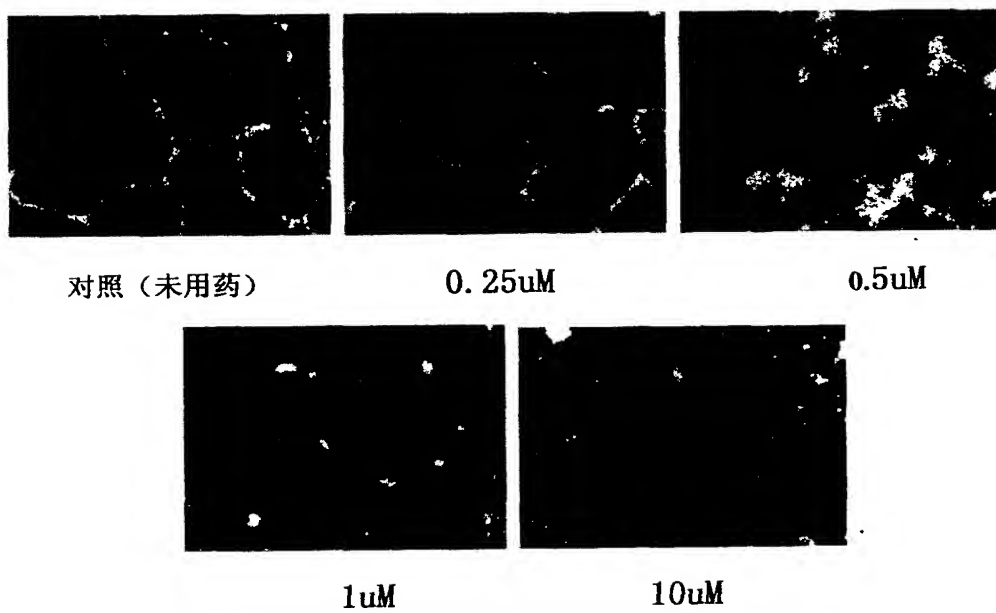


图 2

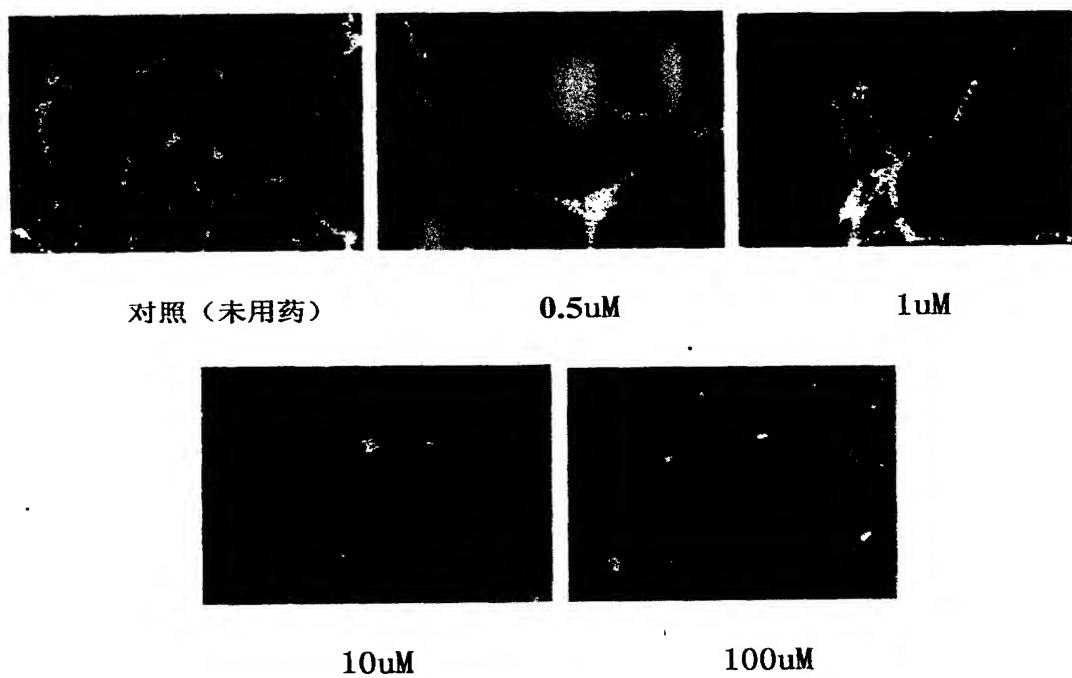


图 3

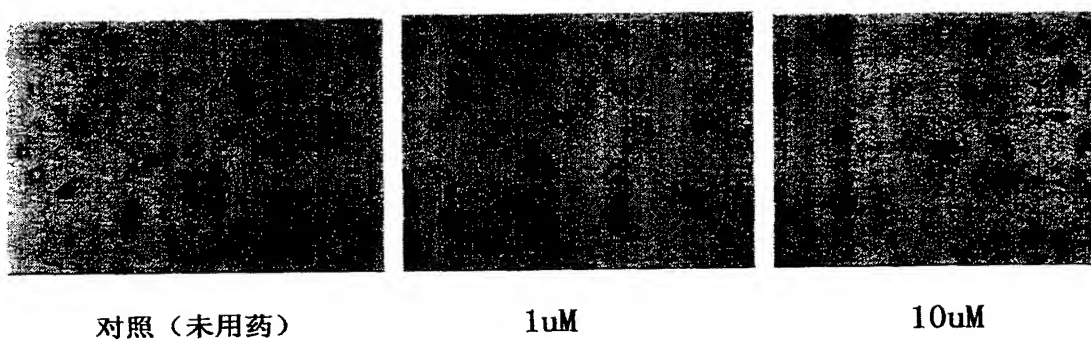


图 4

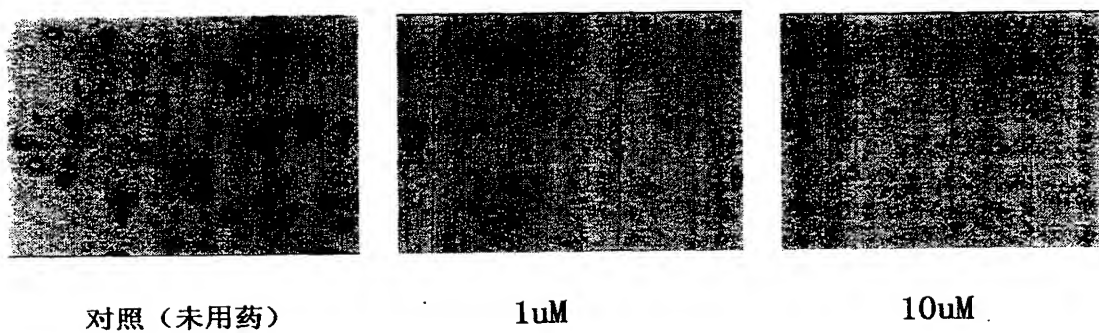


图 5